УДК 577.322.2

С.О. Гайдар, М.О. Чащин

Механізм одновимірної дифузії моторних білків уздовж мікротрубочок цитоскелета

Моторні білки – це молекулярні структури, що перетворюють хімічну енергію гідролізу аденозинтрифосфату на механічну роботу. Вони задіяні у внутрішньоклітинному транспорті везикул, органел і хромосом уздовж мікротрубочок і відіграють важливу роль в аксональному транспорті, клітинних рухах, мітозі та скороченні м'язів. Порушення функцій моторних білків може спричиняти такі тяжкі захворювання, як нейропатія Шарко–Марі–Тус, хвороба Альцгеймера, полікістоз нирок, нейробластома, нейрофіброматоз, ревматоїдний артрит, гіпертрофічна кардіоміопатія, синдром Мая – Хеггліна, лісенцефалія, глухота тощо. Незважаючи на значну фізіологічну роль моторних білків, мало що відомо про механізм їх руху вздовж мікротрубочок. Залишається малозрозумілою природа їх взаємодії, що дозволяє одночасне зв'язування та рух. З використанням наночастинок, подібних до моторних білків як експериментальної моделі, нами запропонована теоретична модель, яка дає змогу пояснити механізм такої взаємодії.

Ключові слова: кінезин, моторні білки, мікротрубочки, дифузія, наночастинки.

Моторні білки – це молекулярні структури, що перетворюють хімічну енергію гідролізу АТФ на механічну роботу, пов'язану з низкою фізіологічно важливих процесів. Вони поділяються на три класи: кінезини, динеїни та міозини. Функції кінезинів можна поділити на дві головні групи: переміщення клітинних компонентів (везикули комплексу Гольджі, мітохондрії, пероксисоми, лізосоми, мРНК, білки, елементи цитоскелета, вірусні частинки тощо) через цитоплазму по мікротрубочках та організація мітотичного веретена, що складається з приєднання та руху хромосом, антипаралельного ковзання мікротрубочок під час формування веретена та регуляція їхньої динаміки.

Різноманітні розлади цих функцій у людини викликають значну кількість захворювань. Порушення можуть бути поділені на три групи: зміни транспорту фізіологічних клітинних компонентів; набуття функції переносу нефізіологічного екзогенного матеріалу, наприклад вірусів; невиконання функцій, які забезпечують мітоз. Щодо першої групи, то відсутність внутрішньоклітинного транспорту кінезином KIF5 може бути одним з факторів, що призводить до хвороби Альцгеймера [12]. Асоційовані з мікротрубочками білки tau здатні зупиняти рух кінезинів, що також може сприяти цьому захворюванню [6]. Мутації в моторному домені KIF1Bв, перешкоджаючи переносу попередників синаптичних везикул, можуть викликати нейропатії Шарко–Марі–Тус за типом 2A [37]. Неефективний транспорт кінезинами KIF3 матеріалу, необхідного для побудови таких клітинних компонентів, як війки та джгутики, призводить до цілої низки захворювань [25]. Наприклад, відсутність формування сенсорних війок у нирках спричинює їх полікістоз [27]. Схожим чином нездатність вузлових війок рухати морфоген під час гаструляції проявляється в інвертованому розташуванні органів [22]. Порушення кінезином KIF3 внутрішньоклі-

© С.О. Гайдар, М.О. Чащин

тинного переміщення матеріалу між сегментами фоторецептора призводить до пігментного ретиніту [17]. Слід відзначити, що місцеві анестетики (наприклад, льодокаїн) можуть зупиняти антероградний транспорт в аксоні саме перешкоджаючи руху кінезинів [21].

Прикладом другої групи є захворювання, під час яких кінезини переносять вірусні частинки та вірусні білки. Так, віруси герпесу для свого руху від тіла нейрона до закінчення аксона використовують кінезин KIF5 [5]. Білки інших вірусів, наприклад вірусу СНІДу, навпаки, пригнічують кінезинопосередкований внутрішньоклітинний транспорт, руйнуючи мікротрубочки [36].

До третьої групи можуть бути віднесені порушення, коли кінезини беруть участь у формуванні або пригніченні пухлин. Так, кінезин KIF1B може виконувати функцію пригнічувача пухлин, а його недостатня експресія асоційована з деякими нейробластомами [23]. Кінезин KIF5B формує комплекс з білками, що інгібують нейрофіброматоз [10]. Ревматоїдний артрит, що є результатом руйнування хряща суглоба трансформованими фібробластами, пов'язаний з порушенням у гені кінезину KIF10/CENP-E, який відповідає за розходження хромосом під час мітозу [16].

Динеїни беруть участь у процесах поділу клітини та переміщенні клітинних компонентів. Проте на відміну від кінезинів, їх специфічною функцією є забезпечення рухливості вій та джгутиків. Порушення внутрішньоклітинного транспорту цитоплазматичними динеїнами призводить до згладжування звивин кори великих півкуль головного мозку, що є проявом лісенцефалії [31]. Втрата функціональної активності динеїнів у складі вій призводить до гідроцефалії, синдрому нерухливості вій і хронічного запалення дихальних шляхів [11].

Міозини переносять клітинні компоненти та виконують специфічну функцію скорочення м'язів. Вони відрізняються від кінезинів і динеїнів тим, що рухаються головним чином уздовж актинових філаментів. Мутації в генах м'язового міозину 2 реалізується у гіпертрофічній кардіоміопатії [28]. Порушення транспортної функції нем'язовим міозином 2А викликає хворобу Мая – Хеггліна, що проявляється у зменшенні числа тромбоцитів і змінах у морфології тромбоцитів і лейкоцитів [14]. Мутації в генах міозинів 7А [14], 15 [35], 3 [33] та 6 [18] пов'язані з різними формами глухоти та синдрому Ушера. Порушення руху меланосом міозином 5А призводять до альбінізму [26].

Незважаючи на винятково важливу фізіологічну роль моторних білків у внутрішньоклітинному транспорті вздовж мікротрубочок та актинових філаментів, загалом мало що відомо про механізм, який його опосередковує. Вважається, що рух кінезинів по мікротрубочці забезпечується циклічним чергуванням високої та низької спорідненості до мікротрубочки [24]. При високій спорідненості кінезин є нерухомо зв'язаним з мікротрубочкою. У стані з низькою спорідненістю кінезин неспецифічно зв'язаний з мікротрубочкою та дифундує під дією постійних поштовхів з боку молекул розчину. Однак на відміну від вільної молекули кінезину в розчині, що здатна до броунівського руху в усіх трьох вимірах, молекула кінезину, яка неспецифічно зв'язана з мікротрубочкою, дифундує лише в одному вимірі – вперед або назад уздовж мікротрубочки, поки не знайде наступний сайт для специфічного зв'язування. Феномен одновимірної дифузії вздовж мікротрубочки також описано для двох інших класів моторних білків – динеїнів [32] та міозинів [1].

Ключову роль у підтриманні зв'язку низької спорідненості може відігравати електростатична взаємодія позитивно заряджених моторних білків і негативно заряджених мікротрубочках. Ці взаємодії

можуть, утримуючи моторний білок біля мікротрубочки, дати змогу йому дифундувати вздовж неї. Показано, що мікротрубочки виступають як високозаряджені негативні поліелектроліти, тобто здатні конденсувати позитивно заряджені іони (наприклад, іони калію та кальцію) з розчину на своїй поверхні, де вони виконують ці одновимірні рухи [19]. Авторами було висунуте припущення, що позитивно заряджені моторні білки можуть мати властивості полівалентних катіонів та конденсуватися на поверхні мікротрубочки. Для того щоб перевірити це припущення проведено серію експериментів [20], в яких за допомогою темнопольної мікроскопії візуалізовано взаємодію мікротрубочки (негативно зарядженої) та позитивно заряджених поліакриламідних наночастинок, що використовувались як модель моторного білка в стані з низькою спорідненістю до мікротрубочки. Підтверджено, що позитивно заряджені наночастинки конденсуються на поверхні мікротрубочки та виконують одновимірні броунівські рухи вздовж неї. Аналіз руху наночастинок уздовж мікротрубочок показав, що їхня константа дифузії нелінійно залежить від іонної сили та має мінімум при 0,07 М [20].

Така поведінка наночастинок відображає тенденцію, що загалом спостерігається для одновимірної дифузії моторних білків у стані з низькою спорідненістю. При цьому константа дифузії залежала від іонної сили розчину. Зокрема, для динеїну [32], кінезину Eg5 [13] і кінезину-1 [7] встановлена лінійна залежність. Для кінезину Ncd ця залежність була нелінійною, з мінімальною константою дифузії при іонній силі розчину близько 0,05 М [7]. Оскільки чутливість константи дифузії до іонної сили розчину відображає електростатичну природу взаємодії моторних білків і мікротрубочок, для з'ясування механізму одновимірної дифузії винятково важливим є розуміння фізико-хімічної природи зв'язку між константою дифузії та іонною силою розчину.

Разом з тим аналогічний феномен було описано для молекул ДНК, що також є високозарядженими негативним поліелектролітами [3, 4, 8, 9, 15, 30, 34]. Проте у переважній більшості випадків для одновимірної дифузії білків вздовж ДНК, константа цієї дифузії не залежала від іонної сили розчину. У разі залежності вона була лінійною. Відмінності цього процесу від одновимірної дифузії вздовж мікротрубочок викликають багато питань щодо її механізму взагалі та в системі моторний білок – мікротрубочка зокрема.

Нами запропонована гіпотеза, яка може пояснити механізм виникнення цих залежностей. Вона базується на теоретичній моделі одновимірної дифузії у системі ДНК – позитивно заряджений білок [4, 15]. Представимо одновимірну дифузію вздовж мікротрубочок за допомогою процесу "стрибків", які складаються з дисоціації, тривимірної дифузії в розчині та швидкої реасоціації наночастинки до тієї ж мікротрубочки. Сумарний рух наночастинок уздовж мікротрубочки, який ми спостерігаємо, може бути описано чергуванням одновимірної дифузії (поки наночастинка конденсована на мікротрубочці) з тривимірною дифузією під час коротких, але частих "стрибків" у розчин. Сумарна константа дифузії, що вираховується в результаті аналізу цього руху, є інтегральним параметром константи повільної одновимірної дифузії (близько 0,05 мкм^2/с) і константи швидкої тривимірної дифузії (близько 24 мкм^2/с) під час "стрибків" (перша константа – це мінімальна величина сумарної константи дифузії наночастинок [20], що описує рух, коли впливом "стрибків" можна знехтувати [4]; друга константа – це гідродинамічно зумовлене значення для вільної дифузії в розчині, що дорівнює $k_BT/6\pi r$ [1], де k_B – константа Больцмана, Т – температура розчину (300° К), з – в'язкість води за вищезазначеної температури (0,9 г/м [8]),

r – радіус наночастинки (10 нм [20])). Як видно зі значень констант дифузії, короткі, проте часті епізоди тривимірної дифузії будуть визначати цю сумарну величину. Константи одно- та тривимірної дифузій є величинами незалежними від іонної сили розчину, однак остання може впливати на співвідношення двох дифузій у сумарному русі.

Вважаючи наночастинки за модель моторного білка в стані з низькою спорідненістю, розглянемо два теоретичних випадки, коли такий вплив реалізується в лінійній або нелінійній залежностях сумарної константи дифузії від іонної сили розчину.

Коли сумарна константа дифузії збільшується прямо пропорційно іонній силі розчину, взаємодія, що опосередковує асоціацію між негативно зарядженою мікротрубочкою та позитивно зарядженими наночастинками, є електростатичною за природою. Тоді константа асоціації обернено пропорційна іонній силі розчину, що пов'язано зі збільшенням концентрації катіонів та аніонів, які екранують електростатичну взаємодію позитивно заряджених наночастинок і негативної мікротрубочки. У свою чергу, тривалість перебування наночастинки в розчині під час "стрибка" є величиною, обернено пропорційною константі асоціації. Підвищення іонної сили розчину дає змогу наночастинці під час "стрибка" перебувати в розчині довше. Це, буде збільшувати сумарну константу дифузії для руху наночастинки вздовж мікротрубочки.

Випадок, коли сумарна константа дифузії нелінійно залежить від іонної сили розчину, можна пояснити таким чином. Відомо, що для електростатичної взаємодії константа асоціації обернено пропорційна величині іонної сили розчину. Проте інколи константа асоціації між негативно зарядженим поліелектролітом та позитивно зарядженим амфолітним білком може змінюватися нелінійно та мати максимальне значення при певній іонній силі [29]. Враховуючи це та дані про поліелектролітні характеристики мікротрубочки [19], ми пропонуємо розглядати останню як поліамфоліт, на поверхні якого негативно заряджені домени мають більший заряд і розташовані ближче до позитивно зарядженої наночастинки, ніж позитивно заряджені домени. Взаємодія наночастинки та поліамфолітної мікротрубочки може бути представлена сумою сильного притягання до близьких негативно заряджених і слабкого відштовхування від далеких позитивно заряджених доменів. Тоді монотонне збільшення іонної сили буде спочатку екранувати далеке відштовхування і лише потім відштовхування та притягання будуть значною мірою нейтралізуватися [29]. Іонна сила, за якої відштовхування вже максимально екрановане, а притягання ще залишається майже незмінним (константа асоціації максимальна), буде точкою з мінімальною константою дифузії, оскільки остання обернено пропорційна константі асоціації.

Таким чином, механізм руху позитивно зарядженої наночастинки та моторних білків у стані з низькою спорідненістю вздовж негативно зарядженої мікротрубочки може полягати у чергуванні повільної одновимірної дифузії зі швидкою тривимірною. Залежність константи дифузії від іонної сили розчину можна пояснити її впливом на співвідношення двох типів дифузій у сумарному русі наночастинки вздовж мікротрубочки. Нелінійна залежність константи дифузії від іонної сили може виникати як результат поліамфолітної природи мікротрубочок.

С.А. Гайдар, Н.А. Чащин

МЕХАНИЗМ ОДНОМЕРНОЙ ДИФФУЗИИ МОТОРНЫХ БЕЛКОВ ВДОЛЬ МИКРОТРУБОЧЕК ЦИТОСКЕЛЕТА

Моторные белки – это молекулярные структуры, преобразующие химическую энергию гидролиза аденозинтрифосфата в механическую работу. Они задействованы в внутриклеточном транспорте везикул, органелл и хромосом вдоль микротрубочек и играют важную роль в аксональном транспорте, клеточных движениях, митозе и сокращении мышц. Нарушение функций моторных белков может вызывать такие тяжелые заболевания, как

нейропатия Шарко–Мари–Тус, болезнь Альцгеймера, поликистоз почек, нейробластома, нейрофиброматоз, ревматоидный артрит, гипертрофическая кардиомиопатия, синдром Мая – Хегглина, лиссэнцефалия, глухота и т.д. Несмотря на значительную физиологическую роль моторных белков, мало что известно о механизме их движения вдоль микротрубочек. Остается малопонятным природа их взаимодействия позволяющая одновременное связывания и движение. С использованием наночастиц, подобных моторным белкам как экспериментальной модели, нами предложена теоретическая модель, позволяющая объяснить механизм такого взаимодействия.
Ключевые слова: кинезин, моторные белки, микротрубочки, диффузия, наночастицы.

S. Gaidar, M. Chashchyn

A HOPPING MODEL FOR ONE-DIMENSIONAL DIFFUSION OF NANOPARTICLES AND MOTOR PROTEINS ALONG MICROTUBULES

One-dimensional diffusion is a mechanism for positively charged structures (e.g. nanoparticles, DNA bound proteins, motor proteins) to translocate along a single molecule of negatively charged linear polyelectrolyte such as microtubules or DNA. Kinesins and dynein are motor proteins that move cargoes (e.g. vesicles, organelles, chromosomes, virus particles) through the eukaryotic cell cytoplasm along microtubules. Myosin is actin based motor protein that also capable of diffusion on microtubules, significantly enhancing the processive run length of kinesin when both motors are present on the same cargo. Defective transport of cell components by motor proteins is implicated in such diseases as Alzheimer's disease, polycystic kidney disease, neuropathy of Charcot–Marie–Tooth, neuroblastomas, neurofibromatosis, rheumatoid arthritis, hypertrophic cardiomyopathy and deafness. However, little is known about the precise mechanism of motor proteins movement along the microtubules. The phenomenon of one-dimensional diffusive motion along microtubules is presumed to underlay this mechanism. In this paper, a similar phenomenon described for DNA binding proteins is reviewed. Based on kinesin-like nanoparticles as an experimental model, a theoretical model for one-dimensional diffusive motion of kinesins along microtubules is proposed. The motion is explained by the "hopping" process: combination of one-dimensional ("sliding") and three-dimensional ("hops") diffusions. Non-linear dependence of kinesin and nanoparticle diffusion constant on ionic strength is proposed to be underlain by polyampholyte structure of microtubules.
Key words: Kinesin, motor proteins, microtubules, diffusion, nanoparticles.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine; Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ali M.Y., Lu H., Bookwalter C.S. et al. Myosin V and Kinesin act as tethers to enhance each others' processivity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Mar 25; **105**(12). – P. 4691–4696.
2. Berg H.C. Random Walks in Biology. – Princeton: Princeton Univ. Press, 1993. – 400 p.
3. Blainey P.C., van Oijen A.M., Banerjee A. et al. A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA // Proc. Natl .Acad. Sci. USA. – 2006. – **103**. – P. 5752–5757.
4. Bonnet I., Biebricher A., Portй P.L. et al. Sliding and jumping of single EcoRV restriction enzymes on non-cognate DNA // Nucleic Acids Res. – 2008. – **36**. – P. 4118–4127.
5. Diefenbach R.J., Miranda-Saksena M., Diefenbach E. et al. Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain // J. Virol. – 2002. – **76**. – P. 3282–3291.
6. Dixit R., Ross J.L., Goldman Y.E. et al. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau // Science. – 2008. – **319**. – P. 1086–1089.
7. Furuta K., Toyoshima Y.Y. Minus-end-directed motor Ncd exhibits processive movement that is enhanced by microtubule bundling in vitro // Curr Biol. – 2008. – **18**. – P. 152–157.
8. Gorman J., Chowdhury A., Surtees J.A. et al. Dynamic basis for one-dimensional DNA scanning by the mismatch repair complex Msh2-Msh6 // Mol. Cell. – 2007. – **28**. – P. 359–370.
9. Granйli A., Yeykal C.C., Robertson R.B. et al. Long-distance lateral diffusion of human Rad51 on double-stranded DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – **103**. – P. 1221–1226.
10. Hakimi M.A., Speicher D.W., Shiekhattar R. The motor protein kinesin-1 links neurofibromin and merlin in a common cellular pathway of neurofibromatosis // J. Biol. Chem. – 2002. – 277 p.
11. Ibanez-Tallon I. Loss of function of axonemal dynein Mdnah5 causes primary ciliary dyskinesia and hydrocephalus // Hum. Mol. Genet. – 2002. – **11**. – P. 715–721.
12. Kamal A., Almenar-Queralt A., LeBlanc J.F. et al. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP // Nature. – 2001. – **414**. – P. 643–648.
13. Kapitein L.C., Kwok B.H., Weinger J.S. et al. Microtubule cross-linking triggers the directional motility of kinesin-5 // J. Cell Biol. – 2008. – 182. – P. 421–428.
14. Kelley M.J. Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May-Hegglin anomaly // Nat. Genet. – 2000. – **26**. – P. 106–108.
15. Komazin-Meredith G., Mirchev R., Golan D.E. et al. Hopping of a processivity factor on DNA revealed by single-molecule assays of diffusion // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – **105**. – P. 10721–10726.
16. Kullmann F., Judex M., Ballhorn W. et al. Kinesin-like

protein CENP-E is upregulated in rheumatoid synovial fibroblasts // Arthritis Res. – 1999. – **1**. – P. 71–80.
17. Marszalek J.R., Liu X., Roberts E.A. et al. Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin-II in mammalian photoreceptors // Cell. – 2000. – **102**. – P. 175–187.
18. Melchionda S. et al. MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss // Amer. J. Hum. Genet. – 2002. – **69**. – P. 635–640.
19. Minoura I., Muto E. Dielectric measurement of individual microtubules using the electroorientation method // Biophys J. – 2006. – **90**. – P. 3739–3748.
20. Minoura I., Muto E. One-dimensional diffusion of charged nanoparticles along microtubules // Biophysics J. – 2006. – **46**. – P. S218.
21. Miyamoto Y., Muto E., Mashimo T. et al. Direct inhibition of microtubule-based kinesin motility by local anesthetics // Biophys. J. – 2000. – **78**. – P. 940–949.
22. Nonaka S., Tanaka Y., Okada Y. et al. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein // Cell. – 1998. – **95**. – P.829–837.
23. Ohira M., Kageyama H., Mihara M. et al. Identification and characterization of a 500-kb homozygously deleted region at 1p36.2-p36.3 in a neuroblastoma cell line // Oncogene. – 2000. –**19**. – P. 430–432.
24. Okada Y., Higuchi H., Hirokawa N. Processivity of the single-headed kinesin KIF1A through biased binding to tubulin // Nature. – 2003. – **424**. – P. 574–577.
25. Pazour G.J., Rosenbaum J. Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases // Trends Cell Biol. – 2002. – **12**. – P. 551–555.
26. Provance D.W. Melanophilin, the product of the leaden locus, is required for targeting of myosin-Va to melanosomes // Traffic. – 2002, №3. – P. 124–132.
27. Qin H., Rosenbaum J.L., Barr M.M. An autosomal recessive polycystic kidney disease gene homolog is involved in intraflagellar transport in C. elegans ciliated sensory neurons // Curr. Biol. – 2001. – **11**. – P. 457–461.
28. Seidman J.G., Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms // Cell. – 2001. – **104**. – P. 557–567.
29. Seyrek E., Dubin PL., Tribet C. et al. Ionic strength dependence of protein-polyelectrolyte interactions // Biomacromolecules. – 2003. – **4**. – P. 273–282.
30. Tafvizi A., Huang F., Leith J.S. et al. Tumor suppressor p53 slides on DNA with low friction and high stability // Biophys J. – 2008. – **95**. – P. L01-L013.
31. Tai C.Y. Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function // J. Cell Biol. – 2002. – **156**. – P. 959–968.
32. Vale R.D., Soll D.R., Gibbons I.R. One-dimensional diffusion of microtubules bound to flagellar dynein // Cell. – 1989. – Dec 1. –**59**(5). – P. 915–925.
33. Walsh T. et al. From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. –**99**. – P. 7518–7523.
34. Wang Y.M., Austin R.H., Cox E.C. Single molecule measurements of repressor protein 1D diffusion on DNA // Physipl Rev Lett. – 2006. – **97**. – P. 048302.
35. Wang A. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3 // Science. – 1998. – **280**. – P. 1447–1451.
36. Watts N.R., Sackett D.L., Ward R.D. et al. HIV-1 rev depolymerizes microtubules to form stable bilayered rings // J. Cell Biol. – 2000. – **150**. – P. 349–360.
37. Zhao C., Takita J., Tanaka Y. et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta // Cell. – 2001. – **105**. – P. 587–597.

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка, Україна; Ін-т молекуляр. біології і генетики НАН України, Київ
E-mail: sgaidar@gmail.com

Матеріал надійшов до редакції 02.11.2009